

ORIGINAL ARTICLE/ARTICOLO ORIGINALE

34° CONGRESSO NAZIONALE BOLOGNA 2015 VINCITORE PREMIO RICCARDO GARBEROGLIO

Confocal scanner laser evaluation of bactericidal effect of different antibiotic mixtures used for dental pulp regeneration: a preliminary study



Valutazione con il microscopio confocale a scansione laser dell'effetto battericida di miscele antibiotiche utilizzate nella rigenerazione pulpare: valutazione preliminare

Genta Elisa^{1,*}, Alovisei Mario¹, Cuffini Anna Maria²,
Mandras Narcisa², Luganini Anna³, Roana Janira²,
Pasqualini Daminano¹, Scotti Nicola¹, Berutti Elio¹

¹ Università di Torino, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Dental School, Endodonzia, Torino, Italy

² Università di Torino, Dipartimento di Salute Pubblica e Microbiologia, Torino, Italy

³ Università di Torino, Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Torino, Italy

Received 24 February 2016; accepted 5 April 2016

Available online 19 May 2016

KEYWORDS

antibiotics;
Trimix pulp
regeneration;
confocal scanner;
Triclaritro.

Abstract

Aim: Evaluate the antibacterial efficacy and depth of action into dentinal tubules of different antibiotic mixtures used for dental pulp regeneration (1-9).

Methodology: Cylindrical specimens of radicular dentine (n = 72), sterilized with ethylene oxide, have been infected with *Enterococcus Faecalis* (3×10^7 CFU/mL) for 3 weeks (10). Specimens were randomly assigned to 3 experimental groups (n = 20) plus positive (n = 6) and negative (n = 6) controls.

* Corrispondenza: Via A. Guglielmi 23, Livorno Ferraris (VC). Tel.: +3493884875.

E-mail: genta.elisa@gmail.com (G. Elisa).

Peer review under responsibility of Società Italiana di Endodonzia.



Production and hosting by Elsevier

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gien.2016.04.008>

1121-4171/© 2016 Società Italiana di Endodonzia. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

PAROLE CHIAVE

antibiotici;
Trimix;
rigenerazione pulpare;
microscopio a laser
confocale;
Triclaritro.

- TRIMIX group (ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina)
- BIMIX group (ciprofloxacina e metronidazolo)
- TRICLARITRO group (ciprofloxacina, metronidazolo e claritromicina)

Each experimental group was divided in two subgroups exposed to antibiotic paste formulations added to macrogol (MG) or ialuronic acid (HA). After 3 weeks of exposition to antibiotic formulations, all specimens were vertically fractured and analyzed with confocal laser scanning microscopy (CLSM) and viability staining (Live/Dead BacLight Viability Stain) to quantitatively evaluate the ratio of dead/live bacteria into dentine tubules (11-12). Volume ratio of red fluorescence (Dead bacteria) was calculated in three-dimensional reconstructions. Differences among groups were analyzed with Kruskal-Wallis and post-hoc Dunn's test ($P < 0,05$). Mean penetration depth of action was recorded and differences were analyzed with one-way ANOVA and post-hoc Bonferroni's test ($P < 0,05$).

Results: No significant differences regarding bactericidal effect between TRIMIX and TRICLARITRO were reported ($P > 0,05$). All antibiotic mixtures conveyed by HA showed a better efficacy compared with MG ($P < 0,05$).

TRIMIX penetration mean was higher than TRICLARITRO and BIMIX ($P < 0,05$), but there were no differences between HA and MG sub-groups ($P > 0,05$).

Conclusions: TRICLARITRO antibiotic mixture showed an effective antibacterial action deep into dentinal tubules, without the risk of tooth crown staining (10).

© 2016 Società Italiana di Endodonzia. Production and hosting by Elsevier B.V. Cet article est publié en Open Access sous licence CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Riassunto

Obiettivo: Valutare l'efficacia antibatterica e la profondità d'azione di alcune miscele antibiotiche utilizzate nelle procedure di rigenerazione pulpare (1-9).

Materiali e metodi: Sono stati utilizzati dei campioni cilindrici di dentina radicolare ($n = 72$), sterilizzati con ossido di etilene e in seguito infettati con *E. Faecalis* (3×10^7 CFU/ml) per 3 settimane (10). I campioni sono poi stati suddivisi in maniera casuale in tre gruppi ($n = 20$) con l'aggiunta di controlli positivi ($n = 6$) e negativi ($n = 6$).

- Gruppo TRIMIX (ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina)
- Gruppo BIMIX (ciprofloxacina e metronidazolo)
- Gruppo TRICLARITRO (ciprofloxacina, metronidazolo e claritromicina).

Ogni gruppo è stato suddiviso in 2 ulteriori sottogruppi nei quali le miscele antibiotiche sono state veicolate con macrogol (MG) o acido ialuronico (HA). Dopo 3 settimane di esposizione alle miscele antibiotiche, i campioni sono stati fratturati longitudinalmente ed analizzati con microscopio confocale (CLSM) e colorazione vitale (Live/Dead BacLight Viability) per quantificare la proporzione tra batteri morti e vivi (11-12). I dati di efficacia tramite proporzione tra volume fluorescenza rossa (batteri morti) e fluorescenza totale sono stati analizzati con Kruskal Wallis e post-hoc Dunn's Test ($P < 0,05$). È stata misurata la profondità di penetrazione nei tubuli dentinali ed i risultati sono stati analizzati con one-way ANOVA e post-hoc Bonferroni's test ($P < 0,05$).

Risultati: Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative nell'effetto battericida tra TRIMIX e TRICLARITRO ($P > 0,05$). Tutte le miscele veicolate con HA hanno dimostrato una maggiore efficacia antibatterica comparate con quelle veicolate con MG ($P < 0,05$).

La penetrazione del TRIMIX è risultata maggiore rispetto a TRICLARITRO e BIMIX ($P < 0,05$), mentre non si sono riscontrate differenze tra HA e MG.

Conclusioni: La miscela antibiotica TRICLARITRO ha mostrato un'effettiva efficacia battericida nei tubuli dentinali, senza il rischio di discolorazione dentale.

© 2016 Società Italiana di Endodonzia. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduzione

Alcune miscele di antibiotici sono state proposte per la disinfezione canalare durante le procedure di rigenerazione pulpare.¹⁻⁹ La miscela tuttora validata dall'AAE è il TRIMIX, ed è composta da ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina.¹³ È stata proposta da Hoshino e minociclina.¹³ È stata proposta da

Hoshino e Sato nel 1996⁸ ed ha dimostrato di essere efficace nell'eliminare i patogeni endodontici sia in vitro che in vivo. Tuttavia è riportato che questa miscela possa facilmente indurre discromia dentinale.⁷ L'obiettivo di questo studio preliminare ex-vivo è stato quello di valutare al laser confocale l'efficacia antibatterica della claritromicina in sostituzione della minociclina (TRICLARITRO) nella disinfezione del sistema

canalare. Inoltre è stata valutata l'influenza dell'acido ialuronico (HA) o del macrogol (MG) come veicolanti dei mix antibiotici testati.

Materiali e metodi

Settantadue denti monoradicolati con apice completamente formato sono stati sezionati orizzontalmente 1 mm sotto la giunzione amelocementizia. I campioni cilindrici di dentina radicolare così ottenuti ($n = 72$) (Fig. 1) sono stati sterilizzati con ossido di etilene ed infettati con *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) con una torbidità di 3×10^7 CFU/ml in terreno di coltura (BHI, Oxoid, Milan, Italy) e successivamente incubati a 37°C per 3 settimane.¹² I campioni sono stati suddivisi in maniera casuale in tre gruppi ($n = 20$ campioni in ogni gruppo) confrontati poi con un gruppo di controllo di campioni positivi ($n = 6$) ed uno di campioni negativi ($n = 6$). In ogni gruppo i campioni sono stati esposti ad una delle tre diverse miscele antibiotiche testate: gruppo TRIMIX (ciprofloxacina, metronidazolo e minociclina), gruppo BIMIX (ciprofloxacina e metronidazolo) e gruppo TRICLARITRO (ciprofloxacina, metronidazolo e claritromicina). Ogni gruppo è stato suddiviso in due sottogruppi nei quali i campioni sono stati esposti alle miscele antibiotiche veicolate con macrogol (MG) o con acido ialuronico (HA). Dopo tre settimane a contatto con gli antibiotici, i campioni sono stati accuratamente sciacquati con soluzione salina al fine di rimuovere completamente la pasta antibiotica dal canale. Ogni campione è stato poi esposto alla colorazione vitale (Live/Dead BacLight Viability Stain-Molecular probes, Eugene, OR) e dopo esser stato ulteriormente fratturato (Fig. 2),¹⁰ per esporre una superficie di dentina intonsa, è stato analizzato con il microscopio a laser confocale (Olympus IX70).¹¹ Le immagini ottenute sono state rielaborate con il programma ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD) (Fig. 3). I dati di efficacia tramite proporzione tra fluorescenza rossa (batteri morti) su fluorescenza totale

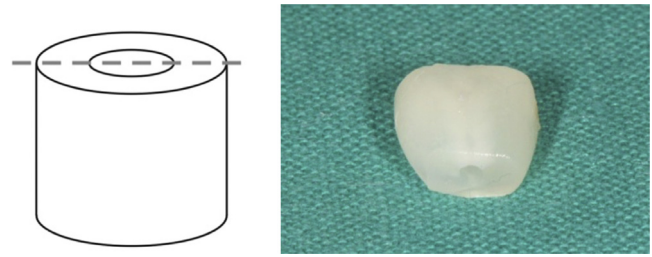


Figura 1 preparazione del campione: sezione 1 mm apicalmente alla CEJ ed eliminazione del terzo apicale della radice per creare sezioni di dentina di forma cilindrica di altezza 4 mm.

verde (batteri vivi) e rossa e di penetrazione nei tubuli dentinali sono stati analizzati con ANOVA e con Kruskal Wallis e post-hoc Dunn's Test ($P < 0,05$).

Risultati

I dati riguardanti la profondità di penetrazione e l'efficacia antibatterica nei vari gruppi sono riportati in Tab. 1.

- Confronto tra miscele antibiotiche

Entità di penetrazione

Le differenze relative all'entità di penetrazione tra le miscele antibiotiche sono state analizzate mediante il test Anova e sono risultate statisticamente significative ($P < 0,05$). La miscela antibiotica TRIMIX ha dimostrato una penetrazione più in profondità rispetto alle altre due miscele antibiotiche. Le differenze nella penetrazione sono state valutate anche con una comparazione delle miscele a coppie ed anche in questo caso sono state riscontrate differenze statisticamente significative nell'entità di penetrazione tra la miscela TRIMIX e le altre due miscele, come riportato in Tab. 2.

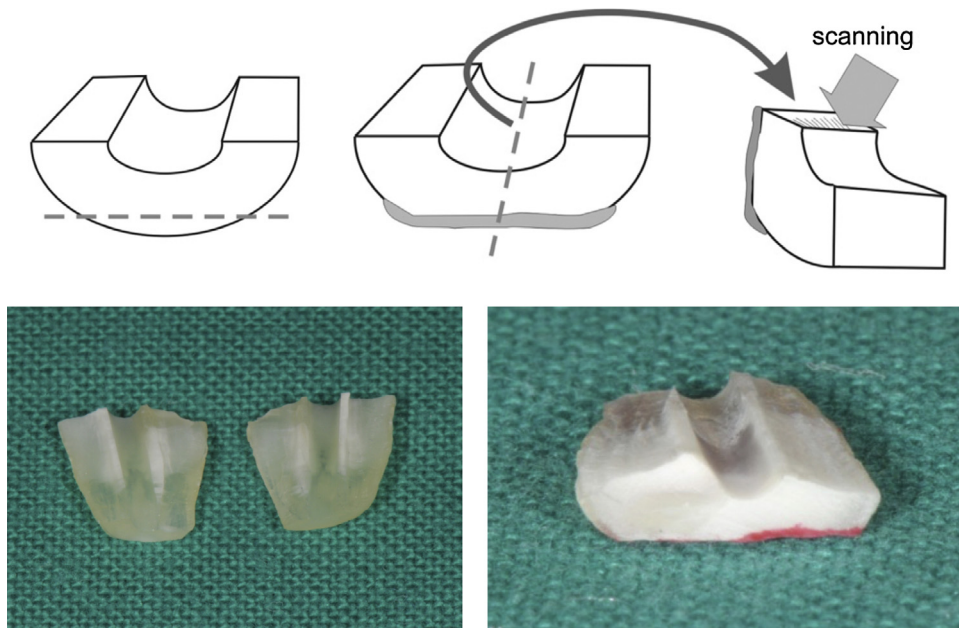


Figura 2 I campioni sono stati sezionati verticalmente ed ulteriormente fratturati con l'ausilio di un bisturi per esporre una quota di dentina intonsa per l'analisi CLSM.

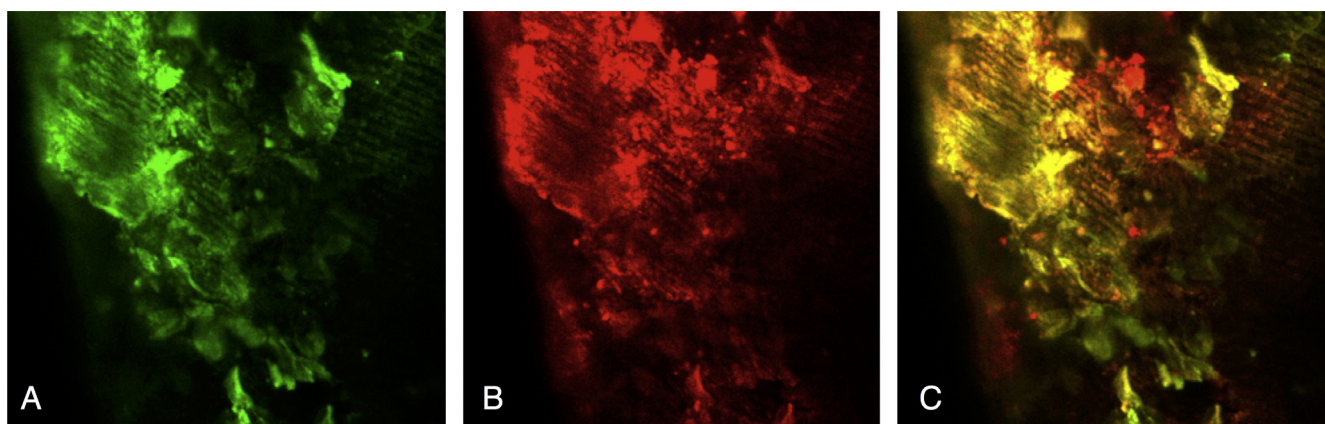


Figura 3 le immagini mostrano le acquisizioni al confocale dei campioni trattati con TRICLARITRO HA. A) batteri vivi (colorati con Syto9); B) batteri morti (colorati con PI); C) acquisizioni MERGE (ImageJ software).

Efficacia antibatterica

Le differenze nell'efficacia antibatterica (Dead ratio) sono state analizzate comparando la percentuale di fluorescenza rossa con la fluorescenza totale verde e rossa. I risultati sono stati analizzati mediante il Kruskal-Wallis test. Il dead ratio delle miscele TRIMIX e TRICLARITRO non è risultato statisticamente significativo tra loro ($P = 0,502$), ma significativamente maggiore rispetto a BIMIX (Tab. 3) ($P < 0,05$).

Tabella 1 Riassunto dei dati di penetrazione ed efficacia antibatterica nei diversi gruppi.

GRUPPI	PENETRAZIONE MEDIA (μm)	FLUORESCENZA ROSSA/TOTALE FLUORESCENZA VERDE E ROSSA (%)
BIMIX HA	202,37	48%
BIMIX MG	168,8	45%
TRICLARITRO HA	268,25	64%
TRICLARITRO MG	246,01	51%
TRIMIX HA	424,81	59%
TRIMIX MG	766,54	51%

Tabella 2 confronto delle differenze di penetrazione tra le diverse miscele antibiotiche.

CONFRONTO	DIFFERENZA	q	P VALUE
TRIMIX vs BIMIX	385,69	6,990	$P < 0,001$
TRIMIX vs TRICLARITRO	315,88	5,572	$P < 0,01$
BIMIX vs TRICLARITRO	-69,812	1,231	$P > 0,05$

Tabella 3 confronto delle differenze di efficacia antibatterica tra le diverse miscele antibiotiche.

CONFRONTO	DIFFERENZA	P VALUE
TRIMIX vs TRICLARITRO	0.02	$P > 0.05$
TRIMIX E TRICLARITRO vs BIMIX	0.5	$P < 0.05$

• Confronto tra veicolanti

Entità di penetrazione

La penetrazione delle miscele antibiotiche è stata valutata anche comparando i due diversi veicolanti: acido ialuronico (HA) e macrogol (MG). Non sono state riscontrate differenze nell'entità di penetrazione tra i due diversi veicolanti nella miscela TRICLARITRO ($p = 0.28$) così come nelle miscele TRIMIX ($p = 0.019$) e BIMIX ($p = 0.36$) (Tab. 4).

Efficacia battericida

I dati riguardanti l'efficacia battericida sono stati analizzati e sono state riscontrate differenze statisticamente significative in tutti i gruppi. La miscela TRICLARITRO veicolata con acido ialuronico ha mostrato una migliore efficacia battericida comparata con la stessa miscela veicolata con macrogol ($p = 0.013$), così come la miscela TRIMIX ($p = 0.019$) e BIMIX ($p = 0.012$) veicolate con acido ialuronico (Tab. 5).

Tabella 4 confronto delle differenze di penetrazione tra i diversi veicolanti.

CONFRONTO	DIFFERENZA	P VALUE
TRIMIX HA vs TRIMIX MG	254,68	$P = 0.119$
TRICLARITRO HA vs TRICLARITRO MG	50,79	$P = 0.285$
BIMIX HA vs BIMIX MG	42,38	$P = 0.361$

Tabella 5 confronto delle differenze di efficacia antibatterica tra le diverse miscele antibiotiche.

CONFRONTO	DIFFERENZA	P VALUE
TRIMIX HA VS TRIMIX MG	0.09	0.019
TRICLARITRO HA VS TRICLARITRO MG	0.12	0.013
BIMIX HA VS BIMIX MG	0.15	0.0125

Discussione e Conclusioni

Lo studio da noi effettuato si pone in continuazione di quello già effettuato da Mandras et al.⁹ e che ha testato in vitro l'efficacia di quattro miscele antibiotiche: TRIMIX, BIMIX, TRIFOSFO E TRICLARITRO. Pertanto lo scopo è di valutare se l'applicazione di claritromicina nella miscela antibiotica al posto della minociclina possa avere un'efficacia paragonabile nella disinfezione canalare e nella profondità di penetrazione nei tubuli dentinali eliminando l'effetto indesiderato della discromia dentale.

La metodica di osservazione utilizzata in questo studio si basa su un modello tridimensionale in vitro per valutare quantitativamente la presenza dei batteri all'interno dei tubuli dentinali dopo la disinfezione tramite il microscopio a laser confocale (CLSM). Il metodo CLSM richiede una preparazione dei campioni relativamente semplice ed è considerata più accurata rispetto a quella della coltura batterica. La distribuzione dei batteri e la loro vitalità può essere quantificata sia verticalmente sia orizzontalmente all'interno della radice e per ogni campione possono essere analizzate diverse sezioni.¹⁰⁻¹¹ La fluorescenza rossa, corrispondente ai batteri morti, è stata valutata sulle immagini ottenute con la scansione CLSM. L'efficacia antibatterica è stata ottenuta rapportando la fluorescenza rossa alla fluorescenza totale verde e rossa.

I risultati hanno dimostrato una fluorescenza rossa maggiore, e dunque una maggiore azione antibatterica, per le miscele TRIMIX e TRICLARITRO. Questo effetto può essere riconducibile ad una maggiore efficacia delle miscele di tre antibiotici (TAP) rispetto a quelle di due (DAP).¹⁴ In particolare la pasta antibiotica TRICLARITRO ha mostrato un'effettiva efficacia antibatterica in profondità nei tubuli dentinali.

Le miscele antibiotiche veicolate con acido ialuronico hanno mostrato un'efficacia antibatterica maggiore rispetto a quelle veicolate con macrogol, probabilmente a causa dell'effetto reservoir svolto dall'acido ialuronico che permette un rilascio più graduale dell'antibiotico. In conclusione la nuova miscela TRICLARITRO HA rappresenta dunque una valida alternativa rispetto alla miscela tradizionale TRIMIX MG nel protocollo di terapia rigenerativa, facilitandone le procedure cliniche.

Rilevanza clinica

La problematica clinica maggiore della miscela tradizionale TRIMIX è la discromia dentinale indotta dalla presenza della minociclina nella formulazione dell'antibiotico. Nonostante alcuni autori abbiano proposto accorgimenti per ridurre tale effetto collaterale, questo non viene eliminato (15). La peculiarità della miscela sperimentale TRICLARITRO è invece quella di non avere l'effetto collaterale della discromia dentale poiché la minociclina viene sostituita dal macrolide claritromicina.

I risultati dello studio da noi condotto hanno mostrato una effettiva efficacia battericida della miscela TRICLARITRO, paragonabile a quella della miscela TRIMIX, eliminando la problematica della discromia dentale. La rilevanza clinica di questo risultato è quella di poter usufruire, nel protocollo

rigenerativo, di una miscela antibiotica ad elevato potere battericida eliminandone il principale effetto collaterale.

Conflitti di interesse

Nell'esecuzione e nei risultati del lavoro non sono stati riscontrati conflitti di interesse.

Ringraziamenti

Un doveroso ringraziamento va a tutti i dipartimenti intervenuti nella realizzazione di questo studio. Un altro ringraziamento va al Dott. Pietro Costamagna, Lecturer presso il Reparto di Endodonzia della Dental School di Torino, per il suo prezioso aiuto nella sperimentazione.

Bibliografia

1. Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent Traumatol* 2012 Feb;28(1):33-41.
2. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res* 1971;79:333-49.
3. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008;34(Suppl):S51-6.
4. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod* 2008;34:876-87.
5. Huang GT. Apexification: the beginning of its end. *Int Endod J* 2009 Oct;42(10):855-66.
6. Diogenes A, Henry MA, Fabricio B, Hargreaves T and K. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics* 2013, 28, 2-23.
7. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth Discoloration of Immature Permanent Incisor Associated with Triple Antibiotic Therapy: A Case Report. *J Endod* 2010;36:1086-91.
8. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *International Endodontic Journal* 1996; 29:125-30.
9. Mandras N, Roana J, Allizond V, Pasqualini D, Crosasso P, Burlando M, et al. Antibacterial efficacy and drug-induced tooth discoloration of antibiotic combinations for endodontic regenerative procedures. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2013;26.
10. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011 Oct;37(10):1380-5.
11. Parmar D, Hauman CH, Leichter JW, McNaughton A, Tompkins GR. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J* 2011 Jul;44(7):644-51.
12. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2012 Oct;38(10):1376-9.
13. AAE, American Association of Endodontists. Considerations for regenerative procedures; 2009.
14. OSTBY BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand* 1961 Dec;19: 324-53.